# 日本国特許庁 JAPAN PATENT OFFICE

1. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:

2002年12月11日

出 願 番 号 Application Number:

特願2002-359956

[ST. 10/C]:

[JP2002-359956]

RECEIVED 05 MAR 2084

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

タカラバイオ株式会社

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月19日

特許庁長官 Commissioner, Japan Patent Office





【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1805

【提出日】 平成14年12月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/70

C12P 21/00

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会

社内

【氏名】 友野 潤

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会

社内

【氏名】 上野 はるみ

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会

社内

【氏名】 岸本 真幸

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会

社内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会

社内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 302019245

【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社

【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 173212

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 ベクター

### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コールドショック蛋白質遺伝子mRNA由来の5,非翻訳領域を コードする領域を有するベクターであって、前記5,非翻訳領域が、該領域が形 成するステム構造の距離が変化するように変異を導入されたものであることを特 徴とするベクター。

【請求項2】 導入された変異が、塩基の挿入若しくは欠失である請求項1記載のベクター。

【請求項3】 配列表の配列番号1中の塩基番号593~598に相当する領域に変異が導入されている請求項1または2記載のベクター。

【請求項4】 5'非翻訳領域をコードする領域がさらにオペレーターを有している請求項1~3いずれか1項に記載のベクター。

【請求項5】 配列表の配列番号2、3、4のいずれかで示される塩基配列の5 ・非翻訳領域をコードする領域を有している請求項4記載のベクター。

【請求項6】 5'非翻訳領域をコードする領域の上流にプロモーターを有している請求項1~5いずれか1項に記載のベクター。

【請求項7】 5<sup>1</sup> 非翻訳領域をコードする領域の下流に、用いる宿主のリボソーマルRNAのアンチダウンストリームボックス配列と相補性を有する塩基配列を有している請求項1~6 いずれか1項に記載のベクター。

【請求項8】 プラスミドベクターである請求項1~7いずれか1項に記載のベクター。

【請求項9】 下記工程を包含することを特徴とする目的蛋白質の発現方法:

- (1)目的蛋白質をコードする遺伝子を組込んだ請求項1~8いずれか1項に記載のベクターで宿主を形質転換する工程、
- (2)得られた形質転換体を培養する工程、
- (3) 培養温度を通常の温度より低下させて目的蛋白質を発現させる工程。

【請求項10】 工程(3)と同時もしくはその後にプロモーターを誘導することを特徴とする請求項9記載の目的蛋白質の発現方法。



### 【発明の詳細な説明】

[0001]

### 【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子組換え技法において使用されるベクター、及び該ベクターを用いた蛋白質の発現方法に関する。

[0002]

### 【従来の技術】

遺伝子組換え技術を用いた有用蛋白質の生産は、今日では広く用いられている 技術である。中でも大腸菌を宿主とした発現系は最も一般的に用いられている発 現系であり、多くの蛋白質が組換体によって生産されるようになってきた。これ ら組換体による有用蛋白質の生産には、RNAポリメラーゼに認識されるプロモーター支配下に目的遺伝子を配置した、いわゆる発現ベクターを構築して用いる のが一般的である。発現ベクターに用いられるプロモーターの例としては、例え ば大腸菌を宿主とする場合には、lac、trp、tac、gal、ara等の プロモーター等が使用されている。また、これら大腸菌のRNAポリメラーゼに 直接認識されるプロモーター以外のものを利用した発現ベクターとして、大腸菌 に感染するバクテリオファージT7のRNAポリメラーゼに認識されるプロモー ターを利用したpETーシステム(ノバジェン(Novagen)社製)(非特 許文献1、非特許文献2参照)がある。pETーシステムの場合、T7RNAポ リメラーゼを大腸菌内で発現させ、このT7RNAポリメラーゼにより発現ベク ター上のT7プロモーター下流に配置された目的遺伝子の転写が行われ、更に宿 主の翻訳システムによって目的蛋白質の合成が行われる。

#### [0003]

しかしながら、pETーシステムも含めた多くの大腸菌発現系で目的蛋白質が高レベルで発現された場合、目的蛋白質が不溶性の複合体、いわゆるインクルージョンボディとなり、活性型の目的蛋白質の量が非常に低くなる場合が多い。いくつかのポリペプチドでは、インクルージョンボディを可溶化後リフォールディング操作を行って活性型ポリペプチドを得た例が報告されているが、一般的にその回収量は低い場合が多く、また、各目的蛋白質ごとに適切なリフォールディン



グ条件を検討する必要がある。そのため、活性型蛋白質を直接大腸菌内で発現させるシステムが求められていた。

### [0004]

インクルージョンボディの形成は、翻訳されたポリペプチド鎖が正しい立体構造にフォールディングする前の中間体の段階で、分子間相互作用により他のポリペプチド鎖と絡み合い、巨大な不溶性の複合体となることによると考えられている。このような場合、組換体大腸菌の培養温度を通常用いられる37℃よりも低い温度(20~30℃)で行うと活性型蛋白質の発現量が増加することが知られている。これは、リボソームによる翻訳の速度が遅くなることにより、中間体が正しい構造にフォールディングする時間的ゆとりが得られることと、低温条件下で細胞内蛋白質分解酵素の働きが遅くなり、発現された活性型蛋白質の安定性が増すためと推測されている。このように、インクルージョンボディとなる蛋白質の生産には、低温条件下で組換体大腸菌を培養する方法は有効な方法として注目されてきた。

### [0005]

一方、対数増殖期の大腸菌の培養温度を37℃から10~20℃に低下させると大腸菌の増殖は一時的に止まり、その間にコールドショック蛋白質と呼ばれる一群の蛋白質の発現が誘導される。該蛋白質はその誘導レベルに応じて第1群(10倍以上)第II群(10倍未満)に分けられ、第1群の蛋白質としては、CspA、CspB、CspG、及びCsdAなどが挙げられる(非特許文献3、非特許文献4参照)。中でもCspA(特許文献1参照)は、37℃から10℃への温度シフトの1.5時間後にその発現量は全菌体蛋白質の13%までに達することから(非特許文献5参照)、低温における組換え蛋白質の生産にcspA遺伝子のプロモーターを利用することが試みられてきた。

# [0006]

cspA遺伝子を用いた低温条件下での組換体蛋白質発現系は、上述のように 該遺伝子のプロモーターが低温で高効率で転写を開始させること以外に、以下の ような有効性が示されている。

(1) cspA遺伝子から転写された翻訳可能なmRNAが機能を有するCsp



A蛋白質をコードしていない場合、より具体的には、CspA蛋白質のN末端配列の一部のみをコードしている場合には、このようなmRNAはコールドショック蛋白質も含めた他の大腸菌蛋白質の発現を長時間阻害し、その間は該mRNAの翻訳が優先的に行われる(非特許文献3、特許文献2参照)。この現象はLACE (low temperature-dependent antibiotic effect of truncated cspA expression) 効果と呼ばれている。

- (2) cspA遺伝子の開始コドンから12塩基下流の位置には、15塩基からなるダウンストリームボックス(downstream box)と呼ばれる配列があり、低温条件下での翻訳効率を高いものにしている。
- (3) cspA遺伝子mRNAの転写開始点から開始コドンまでにある159塩 基からなる5<sup>\*</sup> 非翻訳領域は、CspAの発現に対して、37℃では負の、低温 条件下では正の影響を与えている。

### [0007]

特に上記(1)の現象は、cspA遺伝子を利用して目的の蛋白質のみを特異的に発現させる可能性を示唆するものであり、高純度の組換え蛋白質生産、構造解析のための同位体標識された蛋白質の調製への応用が期待されている。

#### [0008]

一方、該遺伝子のプロモーターの発現調節が不完全であり、その産物が宿主に とって有害であるような遺伝子の場合、発現ベクターを含有する大腸菌を誘導可 能な状態まで培養するのが困難であったり、あるいは発現ベクターの構築すら不 可能なこともあることが知られている(例えば、特許文献3参照)。

#### [0009]

このような問題を解決するとともに、遺伝子発現の効率をより向上させ、発現 産物の取得を容易にする観点から、cspA遺伝子の5'非翻訳領域を使用した 発現ベクターの改変が試みられている(特許文献4参照)。ここには、オペレー ターを導入することにより発現制御を厳密にすること、5'非翻訳領域に変異を 導入して遺伝子発現量を向上させること等の改変が開示されている。

#### [0010]

#### 【特許文献1】



国際公開第90/09447号パンフレット

### 【特許文献2】

国際公開第98/27220号パンフレット

### 【特許文献3】

米国特許第5654169号公報

### 【特許文献4】

国際公開第99/27117号パンフレット

### 【非特許文献1】

ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー (J. Mol.

Biol.)、第189巻、第113~130頁(1986)

#### 【非特許文献2】

ジーン (Gene)、第56巻、第125~135頁(1987)

### 【非特許文献3】

ジャーナル オブ バクテリオロジー(J. Bactriol.) 、第178巻、第4919~4925頁(1996)

#### 【非特許文献4】

ジャーナル オブ バクテリオロジー(J. Bactriol.) 、第178巻、第2994~2997頁(1996)

#### 【非特許文献5】

プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サ イエンシーズ オブ ザ USA (Proc. Natl. Acad. Sc i. USA)、第87巻、第283~287頁 (1990)

#### [0011]

#### 【発明が解決しようとする課題】

上記のように低温条件下での蛋白質発現系は非常に有効なシステムと考えられており、さらに発現効率等について改善されることが望まれている。

#### [0012]

本発明の目的は、csp遺伝子を利用した発現ベクターについて、例えばその遺伝子発現効率を向上させ、より優れた低温条件下での遺伝子発現系を構築する



ことにある。

### [0013]

### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる目的を達成するために c s p 遺伝子由来の 5 , 非翻訳領域についてその塩基配列の改変を導入し、その効果の評価を行った。その結果、 5 , 非翻訳領域部分の m R N A が形成するステム間の距離を調節することにより、その下流にコードされる蛋白質の発現量が上昇することを見出した。そして、 この改変 5 , 非翻訳領域をコードする D N A を含有するベクターを構築し、本発明を完成するに至った。

### [0014]

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はベクターに関し、コールドショック蛋白質遺伝子mRNA由来の5、非翻訳領域をコードする領域を有するベクターであって、前記5、非翻訳領域が、該領域が形成するステム構造の距離が変化するように変異を導入されたものであることを特徴とする。

### [0015]

第1の発明において、5<sup>\*</sup> 非翻訳領域に導入される変異としては塩基の挿入若しくは欠失が例示される。特に好適な態様としては、配列表の配列番号1に示される大腸菌cspA遺伝子中の塩基番号593~598に相当する領域に変異が導入されているベクターが挙げられる。

#### [0016]

第1の発明のベクターは、5<sup>\*</sup> 非翻訳領域をコードする領域がさらにオペレーターを有していてもよい。このようなベクターの 5<sup>\*</sup> 非翻訳領域の特に好適な例として配列表の配列番号 2、3、4に示される塩基配列の 5<sup>\*</sup> 非翻訳領域が挙げられる。

# [0017]

また、第1の発明のベクターは5、非翻訳領域をコードする領域の上流にプロモーターを有していてもよい。さらに、5、非翻訳領域をコードする領域の下流に、用いる宿主のリボソーマルRNAのアンチダウンストリームボックス配列と相補性を有する塩基配列を有していてもよい。



### [0018]

第1の発明のベクターは、例えばプラスミドベクターであってもよい。

#### [0019]

本発明の第2の発明は目的蛋白質の発現方法に関し、下記工程を包含すること を特徴とする。

- (1)目的蛋白質をコードする遺伝子を組込んだ第1の発明のベクターで宿主を 形質転換する工程、
- (2) 得られた形質転換体を培養する工程、
- (3) 培養温度を通常の温度より低下させて目的蛋白質を発現させる工程。

#### [0020]

また、第2の発明においては、工程(3)と同時もしくはその後にプロモーターを誘導してもよい。

#### [0021]

### 【発明の実施の形態】

以下に本発明を具体的に説明する。

本明細書において「領域」とは核酸(DNA又はRNA)上のある範囲を指す。また、本明細書に記載の「mRNAの5'非翻訳領域」とは、DNAからの転写によって合成されるmRNAのうち、その5'側に存在し、かつ蛋白質をコードしていない領域をいう。以降の本明細書においては該領域を「5'ーUTR(5'ーUntranlated Region)」と記載することがある。なお、特に断らない限り5'ーUTRは大腸菌 c s p A遺伝子のmRNA、あるいはこれが改変されたものの5'非翻訳領域をさす。

### [0022]

本発明に使用される、コールドショック蛋白質mRNAの5'-UTRをコードする領域とは、当該遺伝子のmRNAの開始コドンよりも5'側の部分をコードしている領域である。大腸菌のコールドショック蛋白質遺伝子(cspA、cspB、cspG、及びcsdA)にはこの領域が特徴的に見出されており[J.Bactriol.、第178巻、第4919~4925頁(1996)、J.Bactriol.、第178巻、第2994~2997頁(1996)]、これらの遺伝子から転



写されたmRNAのうちの5,末端より100塩基以上の部分が蛋白質に翻訳されない。この領域は遺伝子発現の低温応答性に重要であり、任意の蛋白のmRNAの5,末端にこの5,非翻訳領域を付加することにより、該mRNAから蛋白質への翻訳が低温条件下で起こるようになる。

### [0023]

本発明のベクターには上記に列記されたコールドショック蛋白質遺伝子由来の5'ーUTRをコードする領域を使用することができるが、特に大腸菌cspA遺伝子由来のものが好適に使用できる。大腸菌cspA遺伝子の塩基配列はGenBank 遺伝子データベースに受託番号M30139として登録、公開されている。この塩基配列を配列表の配列番号1に示す。さらに、本発明にはその塩基配列を一部改変した5'ーUTRを使用することもでき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載されたプラスミドpMM047、pMM048等に保持されたcspA遺伝子由来5'ーUTRをコードする領域を使用することができる。上記プラスミドpMM048に保持された大腸菌cspA遺伝子由来の5'ーUTRをコードする領域の塩基配列を配列番号5に示す。当該配列は、本願実施例において使用されているプラスミドpCold08NC2の保持している5'ーUTRをコードする領域の塩基配列と同一である。

### [0024]

本発明は、5'-UTRが形成すると予想される二次構造において、ステム間の距離を調整するような変異を5'-UTRをコードする領域に導入することを特徴とする。例えば、ステム間に相当する部分に塩基を挿入する、若しくはこの部分の塩基の一部を欠失させることによりステム間の距離を広げる、あるいは狭めることができる。このような変異は、当該変異によって変異を導入していないものに比べてその下流に接続された遺伝子の発現量が上昇する限りにおいて、その導入位置、挿入、あるいは欠失される塩基の数には限定はない。また、当該変異としては、5'-UTRの有している低温特異的な遺伝子発現を達成する能力を妨げないものが好ましいことは言うまでもない。

### [0025]

大腸菌cspA遺伝子由来の5'-UTRは、配列表の配列番号1に示される



塩基配列において、塩基番号  $584 \sim 593$ 、 $598 \sim 608$ の領域でそれぞれステム構造を形成することが予想される。したがって、この間の領域(塩基番号  $593 \sim 598$ )、若しくは変異を導入された 5' 一UTRにおける前記領域に相当する領域に塩基の挿入、若しくは欠失を導入することにより、ステム間の距離を調節することができる。なお、本発明は上記のステム間の距離の調節に限定されるものではない。

### [0026]

前記の欠失変異としては、ステム間の領域の1塩基〜全塩基の欠失が本発明に包含される。また、挿入変異としては、 $1\sim100$ 塩基、好ましくは $3\sim60$ 塩基、より好ましくは $8\sim40$ 塩基の挿入が例示される。

### [0027]

特に本発明を限定するものではないが、下記実施例に記載されたプラスミドベクターpCold08s2、pCold08s12、pCold08s32に含まれる5'-UTRは本発明の好適な態様として例示される。前記プラスミドベクターに含まれる5'-UTRの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号2、3、4に示す。

#### [0028]

上記の、本発明により作製される、ステム間の距離が調節された5'-UTRをコードする領域を使用し、本発明の発現ベクターを作製することができる。すなわち、出発材料となる、5'-UTRをコードするDNAについて、そこにコードされるmRNAが形成する二次構造を推定し、ステム間に相当すると予想された位置に公知の手法により挿入または欠失変異を導入し、こうして得られたDNAを適切なプロモーターとともにベクターに組込み、作製すればよい。

#### [0029]

本発明のベクターは、ベクターとしての目的を達成できるものであれば一般的に用いられるベクター、例えばプラスミド、ファージ、ウイルス等のいずれであってもよい。さらに、本発明のベクターは宿主に導入された後にはそのゲノムDNA上に組込まれてもかまわない。

### [0030]



前記の5'-UTRは、本発明のベクターにおいてはプロモーターと目的蛋白質をコードする領域との間に挿入される。本発明に使用されるプロモーターとしては、低温で高いプロモーター活性を有することが期待されるコールドショック蛋白質遺伝子由来のプロモーター、例えばcspA、cspB、cspG、csdAといった遺伝子由来のプロモーターが例示されるがこれらに限定されるものではなく、使用する宿主中でRNAへの転写を開始する活性を有するものであればよい。大腸菌が宿主として用いられる場合には、1ac、trp、tac、gal、ara等のプロモーターを使用することができる。

### [0031]

また、本発明のベクターに含有される上記の構成要素以外の領域としては、例 えば複製起点、選択マーカーとして使用される薬剤耐性遺伝子、オペレーター、 ターミネーター等の調節配列を有することができる。

#### [0032]

前記オペレーターとしては種々の遺伝子の発現調節領域に存在するオペレーター、例えば、大腸菌ラクトースオペロン由来のlacオペレーターを本発明に使用することができる。lacオペレーターは適当な誘導物質、例えばラクトースやその構造類似体、特に好適にはイソプロピルー $\beta$ -Dーチオガラクトシド(IPTG)の使用によってその機能を解除し、プロモーターを作用させることが可能である。このようなオペレーター配列は、通常、プロモーター下流の転写開始点付近に配置される。

本発明のベクターはさらに、オペレーターの機能に必要な調節遺伝子、例えば lacオペレーターに対してはlacIQ遺伝子等を有していてもよい。

### [0033]



。アンチダウンストリームボックス配列と相補性を有する配列は、開始コドンから数えて1~15塩基目程度のところから始まるように配置されると効果的である。目的蛋白質をコードする遺伝子は、該蛋白質がこれらのN末端ペプチドとの融合蛋白質として発現されるようにベクターに組込まれるか、あるいは、目的蛋白質をコードする遺伝子がアンチダウンストリームボックス配列と相補性を有するように、部位特異的変異導入法により塩基置換が導入されることができる。目的蛋白質が融合蛋白質として発現されるようにベクターに組込まれている場合、該ペプチドは目的蛋白質が活性を失わない範囲で任意の長さのものであってよい。このような融合蛋白質発現用ベクターは、例えば適当なプロテアーゼによって該融合蛋白質から目的蛋白質を単離できるよう、その接続部分に工夫が施されたもの、精製あるいは検出に利用可能なペプチドと融合蛋白質として発現されるように工夫が施されたもの等であることができる。発現蛋白の精製に利用可能なポリペプチドとしては、特に限定するものではないが、例えばヒスチジンータグ(His-Tag)やグルタチオンーSートランスフェラーゼ(GST)等が例示される。

### [0034]

例えば、プラスミドとして構築された本発明のベクターを使用した目的蛋白質の発現は以下のような工程で実施される。本発明のプラスミドベクターに目的の蛋白質をコードする遺伝子をクローニングし、該プラスミドで適当な宿主を形質転換することにより、該蛋白質を発現させるための形質転換体を得ることができる。このような形質転換体は培養温度を低下させることにより、目的蛋白質を特異的に発現する。この際、オペレーターを保持するベクターの場合には、適切な手段で当該オペレータの機能を解除し、プロモーターを誘導してもよい。

### [0035]

本発明のベクターを使用した蛋白質の発現においては、前記のLACE効果のために目的の蛋白質の翻訳が優先的に行われるため、従来の組換え蛋白質の発現に比較して培養物あたりの目的蛋白質の含量が高い。したがって高純度の目的蛋白質を調製することが可能である。さらに、適切な同位体の存在下に目的蛋白質の発現を実施して同位体標識された蛋白質を調製することができる。こうして得



られた高純度の標識蛋白質はNMRによる構造解析に適しており、例えば培養物、もしくはその溶解物を直接NMR解析に供することも可能である。

[0036]

### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施 例のみに限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス(T. Maniatis )ら編集、モレキュラー クローニング:ア ラボラトリー マニュアル第2版(Molecular Cloning:A Labora tory Manual 2nd ed. )に記載の方法によった。更に、以下に示すプラスミドの構築には、特に記載のない限り大腸菌 J M 1 0 9  $\varepsilon$  宿主とし、5 0  $\mu$  g / mlのアンピシリンを含むLB培地(トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、N a C 1 0.5%、p H 7.0)あるいは前記培地に1.5%の寒天を加え固化させた LB寒天培地を用いた。

[0037]

参考例 プラスミドpCold08NC2の構築

国際公開第99/27117号パンフレットの記載に基づき、Escherichia co li JM109/pMM047 (FERM BP-6523) に保持されたプラスミドp MM 0 4 7を出発材料としてp C o 1 d 0 8 N C 2を構築した。プラスミドp C o 1 d 0 8 N c 2 は、上流側より順番に1 a c プロモーター、改変された大腸菌 c s p A遺伝子由来 5'ーUTR、マルチクローニングサイトを有するプラスミドである。また、当該プラスミドは、1 a c I 遺伝子、大腸菌 1 6 S リボソーマル R N A 中に存在するアンチダウンストリーム配列に完全に相補的なダウンストリームボックス配列、6個のヒスチジン残基からなるヒスチジンタグおよびファクター X a の認識するアミノ酸配列をコードする塩基配列、をそれぞれ有している。

[0038]

実施例1 pCold08s2ベクターの構築及び蛋白質発現量の検討

(1) プラスミドベクターpCold08s2の構築



下記の操作に従い、参考例 1 記載のプラスミド p C o l d 0 8 N C 2 の 5' - U T R をコードする領域に 2 0 塩基の挿入変異を導入した。

### [0039]

合成プライマーSp20R及びプライマーNheF2(プライマーSp20R及びNheF2の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号8、9に示す)を用いてpCold08を鋳型としたPCRを同様の条件で行なった。このPCR反応液全量を3%(w/v)低融点アガロース電気泳動を行なった後、約150bpの増幅DNA断片をゲルより精製し、これを $5\mu$ 1の滅菌水に懸濁して、増幅断片SNとした。

# [0040]

#### [0041]

こうして得られた反応液にそれぞれ5 p m o l のプライマーN h e F 2、プラ



イマーCSPterR、 $5\mu$ lのEx Taq緩衝液、 $5\mu$ lのdNTP混合液を加え、滅菌水を加えて全量を $100\mu$ lとした。この反応液について94%、1分間、<math>55%、1分間、<math>72%、2分間を1サイクルとする<math>30サイクルのPCRを実施した。このPCR反応液全量を3%(w/v)低融点アガロースで電気泳動した後、約400bpの増幅DNA断片をゲルより精製し、これを $5\mu$ lの滅菌水に懸濁し、増幅断片Sp20-1とした。

# [0042]

Sp20-1を制限酵素NheI、EcoRI(ともにタカラバイオ社製)で2重消化し、生成したDNA断片を1%低融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。この精製DNA断片とNheI及びEcoRIで消化したpCold08を混合し、DNAライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシークエンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し、これをpCold08s2と命名した。このpCold08s2は、pCold08NC2の5'ーUTR(配列表の配列番号5、lacオペレーター中の転写開始点を+1とした)の+120~+121の間に5'ーGAGCGGATAACAATTTCACA-3'の塩基配列(配列番号11)が挿入されている(なお、この位置は配列表の配列番号1に示したcspA遺伝子の塩基配列の塩基番号597~598間に相当する)。pCold08s2に含有されている5'ーUTRの塩基配列を配列番号2に示す。

# [0043]

- (2) 蛋白質発現用プラスミドの構築
- (2) -1 プラスミドベクターpColdO8s2-GFPの構築

オワンクラゲ由来のGFP蛋白質をコードする遺伝子を下記の操作にしたがってpColdO8s2に組み込んだ。プラスミドpQBI63(タカラバイオ社製)を鋳型として、合成プライマーGFPーF及びプライマーGFPーR(プライマーGFPーF及びGFPーRの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号11、12に示す)を用いてPCRを行なった。50ngのpQBI63、5μlのE



Taq緩衝液、8μlのdNTP混合液、それぞれ5pmolのプライマー GFP-F、プライマーGFP-R、0. 5μlのTakara Ex Taq ( タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を50μ1とした。この反応液 について94℃、1分間、55℃、1分間、72℃、1分間を1サイクルとする 30サイクルのPCRを実施した。このPCR反応液後の反応液全量を3%(w /v) 低融点アガロース電気泳動を行なった後、約700bpのGFP遺伝子を 含む増幅DNA断片をゲルより精製し、これを 5 μ 1 の滅菌水に懸濁した。この DNA断片をEcoRIとXbaI (タカラバイオ社製) で2重消化し、1%低 融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。精製したDNA断片とEco RI及びXbaIで消化したpColdO8s2を混合し、DNAライゲーショ ンキット (タカラバイオ社製) を用いて連結した。その後、ライゲーション反応 液を用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含 む L B 寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、D NAシークエンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し 、これをpCold08s2-GFPと命名した。また、同様にして5'UTR への挿入配列のないpCold08NC2にGFP遺伝子を含む増幅DNA断片 を組み込みpCold08-GFPとした。

### [0044]

(2) -2 プラスミドベクターpColdO8s2-H296の構築 フィブロネクチン由来のヘパリン結合ポリペプチドであるH296フラグメント蛋白質をコードする遺伝子を、下記の操作によりpColdO8s2に組み込んだ。

米国特許第5198423号に記載のプラスミドp CH102を鋳型として、合成プライマーH296-F 及びプライマーH296-F 及びH296-R の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号13、14に示す)を用いてP CRを行なった。50ng のp CH102、 $5\mu$ 1のE x Taq 緩衝液、 $8\mu$ 1のdNTP混合液、それぞれ5pm01のプライマーH296-F、プライマーH296-R、0. $5\mu$ 1のTakara E x Taqを加え、滅菌水を加えて全量を $50\mu$ 1とした。この反応液について94  $^{\circ}$  、1分間、



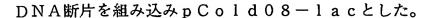
55℃、1分間、72℃、1分間を1サイクルとする30サイクルのPCRを実施した。このPCR反応液全量を3%(w/v)低融点アガロース電気泳動を行なった後、約1kbpの増幅DNA断片をゲルより精製し、これを5μlの滅菌水に懸濁した。このDNA断片をEcoRIとBamHI(タカラバイオ社製)で2重消化し、生成したDNA断片を1%低融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。精製したH296遺伝子を含むDNA断片とEcoRI及びBamHIで消化したpCold08s2を混合し、DNAライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを選択し、これをpCold08s2ーH296と命名した。また、同様にして5′ーUTRへの挿入配列のないpCold08NC2にH296遺伝子を含む増幅DNA断片を組み込みpCold08-H296とした。

# [0045]

# (2) -3 プラスミドベクターpCold08s2-lacの構築

βーガラクトシダーゼ(1 a c Z)遺伝子を含むプラスミドρ KM005(1983年、ニューヨークアカデミックプレス発行、井上正順編集、エクスペリメンタル マニピュレーション オブ ジーン エクスプレッション、第15~32頁)をBamHI、SalI(タカラバイオ社製)で消化後、1%(w/v)低融点アガロース電気泳動を行ない、1ac Z遺伝子を含むDNA断片をゲルより精製してこれを5μ1の滅菌水に懸濁した。この精製DNA断片とBamHI及びSalIで消化したpCold08s2を混合し、DNAライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10μ1を用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシークエンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し、これをpCold08s2−1acと命名した。また、同様にして5′ーUTRへの挿入配列のないpCold08NC2に1ac Ζ遺伝子を含む増幅





### [0046]

- (3)発現量の評価
- (3) -1 pCold08s2-GFP、pCold08s2-H296を用いた発現量評価

実施例1-(2)-1及び(2)-2で作製したpCold08s2-GFP 、pCold08s2-H296及び比較対照としてpCold08-GFP、 pCold08-H296を用いて、大腸菌BL21 (ノバジェン社製) 及びC L83 [ジャーナル オブ バクテリオロジー(J. Bactriol.)、 第180巻、第90~95頁(1998)〕を形質転換した。得られた形質転換 体をそれぞれ50μg/mlのアンピシリンを含む2.5mlのLB培地に接種 し、37℃で一晩振とう培養した。この培養液をそれぞれ3mlの同じ培地に1 %( v / v )ずつ植菌して37℃で振とう培養し、濁度がOD600nm=0. 2に達した時点で、培養温度を15℃に下げて15分間保温した。その後、終濃 度1mMになるようにIPTGを加え、そのまま培養温度を15℃に保ち24時 間振とう培養した。濁度(OD600nm)を測定した後、2m1分の菌体を遠 心分離により集め、100μlの菌体懸濁溶液(50mM トリス塩酸緩衝液、 pH7. 5、150mM 塩化ナトリウム) に懸濁した。前記の濁度から算出し て約3. 75×10<sup>6</sup>個の菌数分に相当する懸濁液をそれぞれ10%SDSポリ アクリルアミド電気泳動に供し、ゲルをCBB(クマジーブリリアントブルー) により染色した後、脱色を行なった(SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は 、生物化学実験のてびき2(化学同人社)に従った)。このゲルについてTot Lab ver. 1. 11 (Nonlinear Dynamics社製 )による画像解析を行い、GFP、H296それぞれの発現量を定量した。この 結果より得られた、pColdO8s2-GFP、pColdO8s2-H29 6 を保持する組み換え体による各蛋白質発現量を、それぞれ 5 'UTRへの挿入 のないpColdO8-GFP、pColdO8-H296のものに対する倍率 として表1に示した。

[0047]





生 1

衣1		
プラスミド・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	宿主	発現倍率*
pCold08s2-GFP	B L 2 1	1. 5倍
	CL83	2. 0倍
pCold08s2-H296	B L 2 1	1. 5倍
	CL83	1. 5倍

\*発現倍率:画像解析の結果から算出されるpColdO8s2クローン体の発現量/pColdO8s2クローン体の発現量/pColdO8pローン体の発現量

### [0048]

表1に示したように、SDSポリアクリルアミドゲル解析の結果、5'UTRに20塩基の挿入を持つpCold08s2をベクターを用いて作製されたクローン体は、pCold08NC2のものを上回る発現量を有していた。

### [0049]

### (3) -2 pCold08s2-lacを用いた発現量評価

実施例1-(2)-3で作製したpCold08s2-lac及び比較対照としてpCold08-lacを用いて、大腸菌BL2l及びCL83を形質転換した。得られた形質転換体をそれぞれ50μg/mlのアンピシリンを含む2.5mlのLB培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。この培養液をそれぞれ3mlの同じ培地に1%(v/v)ずつ植菌して37℃で振とう培養し、濁度がOD600nm=0.2に達した時点で一部サンプリングした後、培養温度を15℃に下げて15分間保温した。その後、終濃度1mMになるようにIPTGを加えて発現を誘導し、そのまま培養温度を15℃に保ちさらに培養した。これら誘導直前の37℃培養液及び誘導後3時間後、24時間後にサンプリングされた培養液を試料として1972年、コールドスプリングハーバーラボラトリー発行、J.H.ミラー(J.H. Miller)著、エクスペリメンツイン モレキュラー ジェネティクス、第352~355頁に記載の方法でβーガラクトシダーゼ活性の測定を行ない、その結果を表2に示した。



#### [0050]

### 【表2】

表2 βーガラクトシダーゼ活性 (ユニット)

プラスミド	宿主	誘導前_	誘導3時間後	誘導24時間後
pCold08-lac	BL21	10110	49510	85550
	CL83	6971	28514	31504
pCold08s2-lac	B L 2 1	9151	66314	119770
	CL83	5172	56028	72459

#### [0051]

表 2 に示したように、誘導 2 4 時間後において、5 'UTRに2 0 塩基の挿入を持つ p C o 1 d 0 8 s 2 -1 a c を保持する形質転換体は、p C o 1 d 0 8 -1 a c を保持するものの 1 . 4 倍(宿主:B L 2 1)、2 . 3 倍(宿主:C L 8 3)の  $\beta$  - ガラクトシダーゼ活性を有していた。

### [0052]

実施例2 pCold08s12、pCold08s32ベクターの構築及び蛋白質発現量の検討

### (1) プラスミドベクターpCold08s12ベクターの構築

プライマーSp20F及びプライマーCSPterRにかえて、プライマーSp12F、プライマーSp12R(プライマーSp12F及びSp12Rの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号15、16に示す)をそれぞれ使用した他は、上記の実施例1ー(1)の操作に従い、参考例1記載のプラスミドpCold08NC2の5'ーUTRをコードする領域に12塩基の挿入変異が導入されたプラスミド、pCold08s12を構築した。

### [0053]

このpCold08s12は、pCold08Nc2の5'-UTR(配列表の配列番号5)の+120~+121の間に5'-ATGTTTTGTAGA-3'(配列番号17)の塩基配列が挿入されている。pCold08s12に含有されている5'-UTRの塩基配列を配列番号3に示す。



### [0054]

(2) プラスミドベクターpCold08s32ベクターの構築

プライマーSp20F及びプライマーSP20Rにかえて、プライマーSp32F、プライマーSp32Rの塩基配列2F、プライマーSp32F及びSp32Rの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号18、19に示す)をそれぞれ使用した他は、上記の実施例1-(1)の操作に従い、参考例1記載のプラスミドpCold08NC2の5'-UTRをコードする領域に32塩基の挿入変異が導入されたプラスミド、pCold08s32を構築した。

### [0055]

このpCold08s32は、pCold08Nc2の5'-UTR(配列表の配列番号5)の+120~+121の間に5'-ATGTTTTGTAGATTTGAAAGAGTAGATTAGTA-3'(配列番号20)の塩基配列が挿入されている。pCold08s32に含有されている5'-UTRの塩基配列を配列番号5に示す。

## [0056]

(3) プラスミドベクターpCold08s12-H296、pCold08s32-H296の構築

実施例1-(2)-1に記載の操作により、H296遺伝子を含む約1kbpのDNA断片を調製してEcoRIとBamHIで2重消化し、1%低融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。この精製DNA断片とEcoRI及びBamHIで消化したpColdO8s12またはpColdO8s32を混合し、DNAライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて連結した。このライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシークエンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し、これらをそれぞれpColdO8s12-H296、pColdO8s32-H296と命名した。

# [0057]

(4) pCold08s12-H296、pCold08s32-H296を用



#### いた発現量の評価

(3)で作製したpCold08s12-H296、pCold08s32-H296及び比較対照としてpCold08-H296を用いて、大腸菌BL21及びCL83を形質転換した。得られた形質転換体をそれぞれ50µg/mlのアンピシリンを含む2.5mlのLB培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。この培養液をそれぞれ3mlの同じ培地に1%(v/v)ずつ植菌して37℃で振とう培養し、濁度がOD600nm=0.2に達した時点で、培養温度を15℃に下げて15分間保温した。その後、終濃度1mMになるようにIPTGを加え、そのまま培養温度を15℃に保ち24時間振とう培養した。こうして得られた培養液について、実施例1-(3)-1に記載の操作により各組換え体におけるH296の発現量を定量した。この結果より得られた、pCold08s12-H296、pCold08s32-H296を保持する組み換え体による各蛋白質発現量を、5'UTRへの挿入のないpCold08-H296のものに対する倍率として表3に示した。

[0058]

【表3】

##	•

プラスミド	宿主	発現倍率*
pCold08s12-H296	B L 2 1	1. 3倍
	CL83	1. 5倍
pCold08s32-H296	B L 2 1	1.4倍
	CL83	1.8倍

\*発現倍率: 画像解析の結果から算出されるpCold08s12またはpColds32 クローン体の発現量/pCold08クローン体の発現量

[0059]

SDSポリアクリルアミドゲル解析の結果、5'-UTR中に12、32塩基を挿入したベクターでは、挿入していないものに比べ発現量が上昇することが判明した。



### [0060]

### 【発明の効果】

本発明により、低温条件において高い発現効率を示す発現ベクターが提供される。該ベクターを用いることにより、目的の蛋白質を特異的に発現させ、高純度の蛋白質標品を調製することができる。また該ベクターを利用して低温条件下で蛋白質発現を行うことにより、活性を保持した蛋白質を効率よく得ることが可能となる。

### [0061]

### 配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:2: Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

SEQ ID NO:3: Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

SEQ ID NO:4: Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

SEO ID NO:5: Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

SEQ ID NO:6: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:7: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:8: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:9: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:10: Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region

of cspA Gene

SEQ ID NO:11 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:12: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:13: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:14: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:15 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:16: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:17: Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region

of cspA Gene

SEQ ID NO:18: Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:19 : Synthetic Primer for PCR



SEQ ID NO:20 : Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region of cspA Gene

[0062]

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Vector

<130> T-1805

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1209

<212> DNA

<213>Escherichia coli

#### <400> 1

aagettegat geaatteacg atecegeagt gtgatttgag gagtttteaa tggaatataa 60 agateeaatg catgagetgt tgageageet ggaacagatt gtttttaaag atgaaacgea 120 gaaaattace etgacgeaca gaacaacgte etgtacegaa attgageagt tacgaaaagg 180 gaeaggatta aaaategatg atttegeeeg ggttttggge gtateagteg eeatggtaaa 240



ggaatgggaa tccagacgcg tgaagccttc aagtgccgaa ctaaaattga tgcgtttgat 300 tcaagccaac ccggcattaa gtaagcagtt gatggaatag acttttatcc actttattgc 360 tgtttacggt cctgatgaca ggaccgtttt ccaaccgatt aatcataaat atgaaaaata 420 attgttgcat cacccgccaa tgcgtggctt aatgcacatc aacggtttga cgtacagacc 480 attaaagcag tgtagtaagg caagtccctt caagagttat cgttgatacc cctcgtagtg 540 cacatteett taaegettea aaatetgtaa ageaegeeat ategeegaaa ggeaeaetta 600 attattaaag gtaatacact atgtccggta aaatgactgg tatcgtaaaa tggttcaacg 660 ctgacaaagg cttcggcttc atcactcctg acgatggctc taaagatgtg ttcgtacact 720 tctctgctat ccagaacgat ggttacaaat ctctggacga aggtcagaaa gtgtccttca 780 ccatcgaaag cggcgctaaa ggcccggcag ctggtaacgt aaccagcctg taatctctgc 840 ttaaaagcac agaatctaag atccctgcca tttggcgggg attttttat ttgttttcag 900 gaaataaata atcgatcgcg taataaaatc tattattatt tttgtgaaga ataaatttgg 960 gtgcaatgag aatgcgcaac gccgtaagta aggcgggaat aatttcccgc cgaagactct 1020 tactctttca atttgcaggc taaaaacgcc gccagctcat aactctcctg tttaatatgc 1080 aattcacaca gtgaatctct tatcatccag gtgaaaaata aaagcgtgaa acaaatcact 1140 attaaagaaa gtaatctata tttctgcgca ttccagctct gtgttgattt cacgagtatg 1200 1209 tactgcacc

<210> 2

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 2

aaattgtgag cggataacaa tttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60



ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120 cgagcggata acaatttcac attaattatt aaaggtaata cacc 164

<210> 3

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 3

aaattgtgag cggataacaa tttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60 ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120 catgttttgt agattaatta ttaaaggtaa tacacc 156

<210> 4

<211> 176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 4

aaattgtgag cggataacaa tttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60 ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120



176

<210> 5

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 5

aaattgtgag cggataacaa tttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60 ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120 cttaattatt aaaggtaata cacc 144

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 6

gtgcggataa caatttcaca ttaattatta aaggtaatac

40



<21	0>	7
$\sim 2$		

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 7

tgcgcattct cattgcaccc

20

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 8

tgtgaaattg ttatccgctc gtgtgccttt cggcgatatg 40

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 9

gttttcccgc tagccaaatt gtgagcggat a

31

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region of cspA

Gene

<400> 10

gagcggataa caatttcaca

20

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 11



# aagataacaa aggaattcga gtaaaggaga agaacttt

38

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 12

tctggacatt ctagattatt tgtatagttc atccatg

37

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 13

ccatccatgg aattcggcta ttcctgcacc aactga

36

<210> 14

<211> 36



<21	25	DNA
< / /	/./	DIM

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 14

gaaaacctag gatccttatg tggaaggaac atccaa

36

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 15

catatcgccg aaaggcacac atgttttgta gattaattat taaaggtaat ac

52

<210> 16

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR



	$\Lambda \Lambda$	10	•
<4	00>	16	١

gtattacctt taataattaa tctacaaaac atgtgtgcct ttcggcgata tg

52

<210> 17

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region of cspA

Gene

<400> 17

atgttttgta ga

12

<210> 18

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 18

52



0.1	^	70
<21	(1)	19

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 19

tactaatcta ctctttcaaa tctacaaaac atgtgtgcct ttcggcgata tg 52

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 20

atgttttgta gatttgaaag agtagattag ta

32





### 【書類名】 要約書

### 【要約】

### 【課題】

低温条件下において目的蛋白質を高効率で発現することが可能な遺伝子発現系 を提供する。

### 【解決手段】

コールドショック蛋白質遺伝子mRNA由来の5,非翻訳領域について該領域が形成するステム構造の距離が変化するように変異を導入し、こうして得られた変異5,非翻訳領域を有するベクターを構築する。該ベクターを保持する宿主をコールドショックが誘導される条件においた場合には目的とする蛋白質が高い効率で発現される。本発明は高純度の組換え蛋白質の調製、構造解析のための蛋白質の同位体標識等に有用である。

### 【選択図】 なし



特願2002-359956

出願人履歴情報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日 [変更理由]

2002年 4月 1日

(変更理田)

新規登録

住 所 氏 名 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

タカラバイオ株式会社